FR

Sérums d'agglutination de Haemophilus influenzae

1. DOMAINE D'APPLICATION

Les sérums d'agglutination de *Haemophilus influenzae* sont destinés à être utilisés lors des tests qualitatifs d'agglutination sur lame et lors de la contre-immunoélectrophorèse (CIEP) pour une identification sérologique du type de structure des souches pathogènes d'*H. influenzae* (types a à f) à des fins épidémiologiques et diagnostiques.

2. RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Les souches pathogènes possèdent des capsules et sont classifiées en 6 types sérologiques selon la structure chimique des antigènes capsulaires.[1] Les souches possédant ces antigènes sont spécifiquement agglutinées par l'antisérum homologue, et le type d'une culture encapsulée peut donc être défini par des tests d'agglutination sur lame. Une technique alternative de typage, la contre-immunoélectrophorèse (CIEP), exploite le fait que, sous des conditions appropriées, les anticorps migrent vers la cathode sous l'influence d'un champ électrique alors que les antigènes migrent vers l'anode. Des suspensions de bactéries provenant d'une culture solide ou liquide et des antisérums sont placés dans des puits creusés dans une couche de gélose, de façon à ce que, lorsque la gélose est exposée à un champ électrique, les antigènes et les anticorps migrent les uns vers les autres, et forment un précipité visible en relativement peu de temps.[2] Dans certaines circonstances, par exemple en cas de méningite bactérienne, il est important de parvenir à l'identification de l'agent infectieux probable le plus rapidement possible, afin de commencer un traitement antimicrobien adapté. L'antigène libre peut souvent être identifié dans les prélèvements de liquide céphalo-rachidien par la technique sensible de CIEP.[3,4] Cette technique d'identification est particulièrement utile quand la concentration bactérienne du liquide céphalo-rachidien est trop faible pour permettre une isolation ou lorsque la viabilité des organismes a été affectée par un traitement antibiotique préalable.

3. PRINCIPE DE LA METHODE

Les tests sérologiques sont basés sur le fait que les anticorps contenus dans le sérum, produits en réponse à l'exposition à des antigènes bactériens, agglutinent les bactéries portant les antigènes homologues.

4. REACTIFS

4.1. COMPOSITION DU COFFRET

Sérums d'agglutination de *Haemophilus influenzae*		2 ml
Type a	(ZM20/R30166001)	1 flacon compte-gouttes
Type b	(ZM21/R30166101)	1 flacon compte-gouttes
Type c	(ZM22/R30166201)	1 flacon compte-gouttes
Type d	(ZM23/R30166301)	1 flacon compte-gouttes
Type e	(ZM24/R30166401)	1 flacon compte-gouttes
Type f	(ZM25/R30166501)	1 flacon compte-gouttes

4.2. DESCRIPTION, PREPARATION ET CONDITIONS DE CONSERVATION RECOMMANDEES

Voir également le paragraphe **Précautions et restrictions d'emploi**.

Les sérums doivent être conservés entre 2 et 8°C pour maintenir leur activité au moins jusqu'à la date inscrite sur le flacon.

AGGLUTINATING SERUM

Sérums d'agglutination de *Haemophilus influenzae*

Les sérums d'agglutination *H. influenzae* sont produits par des lapins et sont conservés avec du phénol à 0,5%. Chaque flacon, doté d'un compte-gouttes et d'une tétine, contient 2 ml de liquide et est fourni prêt à l'emploi.

Lors de leur conservation, il arrive que certains sérums se troublent légèrement. Ceci n'indique pas nécessairement leur détérioration et ne provoque normalement pas d'interférences avec les résultats ; les sérums peuvent cependant être clarifiés par centrifugation ou par filtration à travers une membrane (0,45 µm) avant l'emploi. Les sérums fortement troubles sont contaminés et doivent être jetés.

5. PRECAUTIONS ET RESTRICTIONS D'EMPLOI

IVD

Destiné exclusivement au diagnostic *in vitro*.

Réservé exclusivement à un usage professionnel.

Attention : Ce produit contient du caoutchouc naturel sec.

Pour de plus amples informations sur les composants potentiellement dangereux, se référer à la fiche de sécurité fournie par le fabricant et à l'étiquetage du produit.

5.1. informations de securite

5.1.1 Manipuler toutes les bactéries conformément aux directives appropriées en vigueur.

5.1.2 L'équipement non jetable doit être stérilisé en utilisant une procédure appropriée après l'emploi, bien que la méthode la plus appropriée soit la stérilisation par autoclave pendant au moins 15 minutes à 121°C. Le matériel à usage unique doit être stérilisé par autoclave ou incinéré.

5.1.3 Les éclaboussures de matériaux potentiellement infectieux doivent être éliminées immédiatement à l'aide d'un papier absorbant et les surfaces contaminées doivent être nettoyées avec un désinfectant anti-bactérien standard ou de l'alcool à 70%. Le matériel utilisé pour le nettoyage des éclaboussures, y compris les gants, doit être éliminé comme s'il s'agissait de déchets biologiquement dangereux.

5.1.4 Ne pas effectuer les pipetages à la bouche. Pour manipuler les échantillons et effectuer le test, porter des gants à usage unique et une protection des yeux. Une fois le test terminé, se laver soigneusement les mains.

5.1.5 Ces réactifs contiennent du phénol. Bien que sa concentration soit faible, le phénol est connu comme étant toxique par ingestion et par contact avec la peau. Ne pas avaler les réactifs. Si l'un d'entre eux entre en contact avec la peau ou les yeux, laver la surface en rinçant immédiatement et abondamment à l'eau.

5.1.6 6. Conformément aux bonnes pratiques de laboratoire, il est fortement recommandé de traiter les échantillons et réactifs comme s'ils étaient potentiellement infectieux et de les manipuler avec toutes les précautions nécessaires.

5.2. Precautions d'analyse

5.2.1 Ne pas utiliser les antisérums au-delà de la date de péremption indiquée. Eviter la contamination microbienne des antisérums, ceci pouvant provoquer des résultats erronés et réduire la durée de vie du produit.

5.2.2 Ne pas modifier la procédure du test ni le temps d'incubation ou les températures. Ne pas diluer les sérums d'agglutination.

5.2.3 Après emploi, replacer les sérums à la température de conservation recommandée.

5.2.4 Ne pas utiliser d'anse bactériologique pour distribuer l'antisérum. Utiliser le compte-gouttes fourni.

6. PRELEVEMENT, TRANSPORT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Le sérotypage ne donne des résultats fiables que si la culture contient des capsules. Il est conseillé de sérotyper une souche dès que possible après son isolation car la capacité à produire des capsules disparaît avec le temps. Les souches encapsulées sont reconnaissables par l'iridescence caractéristique visible lorsqu'une forte lumière blanche oblique est projetée sur une culture en roissance sur gélose de Lévinthal.[1]

Pour de plus amples informations sur le prélèvement et la réparation des échantillons, se référer à un manuel standard. Il est recommandé d'utiliser des cultures récentes, en croissance sur une gélose de Lévinthal.

7. PROCEDURE

MATERIEL FOURNI

Voir le paragraphe **Composition du coffret**.

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

1. Sérum physiologique à 0,85%.
2. Lames de verre.
3. Anse bactériologique et bec bunsen.
4. Source de lumière sur fond sombre.
5. Chronomètre.
6. Pipette Pasteur.
7. Tampon barbital-HCl, pH 8,6
   Dissoudre 8,25 g de diéthylbarbiturate de sodium dans 1 litre d'eau distillée et ajouter 38,2 ml d'acide chlorhydrique 0,2N afin d'obtenir un pH de 8,6.
   ATTENTION : Le barbital-HCl est nocif par ingestion. Se laver soigneusement les mains après manipulation.
8. Agarose à 1%
   Ajouter 1 g d'agarose à 100 ml de tampon barbital-HCl et dissoudre en chauffant dans un bain-marie en ébullition pendant 5 à 10 minutes. Mélanger doucement en évitant la formation de bulles d'air et s'assurer que l'agarose se dissout en totalité et se répartit de façon uniforme. Les flacons de gel peuvent se conserver à température ambiante (18 à 30°C) pendant 4 semaines maximum.
9. Lames recouvertes d'agarose
   Faire fondre le contenu d'un flacon de gel d'agarose à 1% dans un bain-marie en ébullition et distribuer sur des lames en verre propres posées sur une surface plane. La couche de gel doit avoir 1 à 1,5 mm d'épaisseur ; pour une lame de 26 x 76 mm, 3 ml d'agarose suffisent, alors qu'une lame de 81 x 81 mm nécessite 10 ml d'agarose. Les lames inutilisées, une fois solidifiées, peuvent être conservées 24 heures entre 2 et 8°C en chambre humide.
10. Appareil d'électrophorèse approprié pour une électrophorèse sur gélose. Un tel équipement est disponible auprès de nombreux fournisseurs.
11. Peigne (tube à extrémité tranchante, 3 mm de diamètre) et appareil d'aspiration.

8. PROCEDURE DU TEST

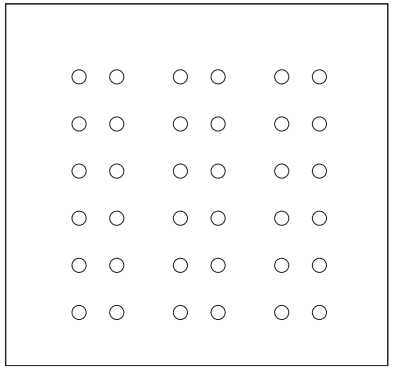
8.1. Test d'agglutination sur lame

Etape 1	Déposer deux gouttes séparées (40 µl chacune) de sérum physiologique sur une lame de verre. Emulsionner les parties de la culture à tester avec une anse, dans chaque goutte de sérum physiologique pour obtenir une suspension homogène et assez dense.
Etape 2	Dans l'une des suspensions utilisées, ajouter une goutte (40 µl) de sérum physiologique comme témoin et homogénéiser. Dans l'autre suspension, ajouter une goutte (40 µl) d'antisérum non dilué et homogénéiser.
Etape 3	Faire osciller la lame pendant une minute et observer s'il se produit une agglutination, plus facilement visible sur un fond sombre éclairé par une lumière indirecte. Eliminer la lame utilisée selon les règles de désinfection et d'élimination appropriées.

8.2. Contre-immunoélectrophorèse

Etape 1	Remplir la cuve de l'appareil d'électrophorèse avec la solution tampon barbital-HCl jusqu'au niveau requis.
Etape 2	Creuser des puits dans l'agarose avec le peigne, en aspirant soigneusement un échantillon de chaque puits à l'aide d'une pipette Pasteur reliée à un système d'aspiration. Veiller à ne pas endommager les parois des puits. Une unité de test est constituée de deux puits de 3 mm de diamètre séparés de 5 mm et placés le long de l'axe d'électrophorèse. Plusieurs de ces unités peuvent être découpées sur chaque lame : une lame de 81 x 81 mm peut accueillir 18 paires de puits (voir la figure 1, qui peut servir de calibre).

Figure 1



Etape 3	A l'aide d'une pipette Pasteur fine, remplir le puits **anodique** de chaque paire avec une quantité suffisante d'**antisérum**, sans faire déborder.
Etape 4	De la même façon, remplir le puits **cathodique** de chaque paire avec l'**échantillon à tester**.
Etape 5	Placer rapidement la lame dans la cuve de l'appareil d'électrophorèse et établir les connexions entre les extrémités de la lame et les compartiments de la solution tampon à l'aide de mèches de papier filtre doux imbibées de solution tampon. Seuls les 10 derniers millimètres d'agarose doivent être couverts par les mèches. Lisser doucement de façon à chasser les bulles d'air. Remettre le couvercle de la cuve en place.
Etape 6	Vérifier la polarité des connexions à la source de courant (l'antisérum est dans les puits anodiques). Brancher le courant et le stabiliser à 2,5 mA/cm de largeur de gel.
Etape 7	Au bout d'une heure, débrancher le courant et retirer la lame de la cuve. Observer avec un éclairage sur fond noir ou un éclairage oblique sur fond noir. La lecture est souvent plus aisée si la lame reste immergée dans une boîte de Petri contenant du sérum physiologique pour l'observation.

9. RESULTATS

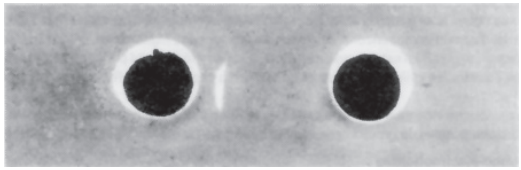
Agglutination sur lame

L'agglutination doit être forte et nettement visible au bout d'une minute. Il ne doit se produire aucune agglutination visible dans la suspension témoin ; dans un tel cas, la suspension n'est pas appropriée pour une analyse par cette méthode.

Contre-immunoélectrophorèse

En cas de résultat positif, un précipité blanc linéaire est visible entre chaque paire de puits, perpendiculairement à l'axe d'électrophorèse (figure 2). En cas de réaction négative, aucun précipité n'est visible entre les puits.

Figure 2



10. CONTROLE QUALITE

Agglutination sur lame

Il est recommandé, de temps en temps, de tester les antisérums comme décrit avec des cultures connues comme étant positives et négatives.

Il est conseillé d'utiliser les cultures homologues comme témoins positifs. Utiliser *Neisseria lactamica* en tant que culture témoin négative. Il est possible de se procurer des souches dotées des sérotypes appropriés dans une souchothèque reconnue telle que NCTC ou ATCC.

11. INTERPRETATION DES RESULTATS

Agglutination sur lame

L'agglutination des souches de type « e » est généralement plus fine que celle des autres.

Les réactions d'agglutination sur lame de faible intensité ou qui ont un délai d'apparition supérieur à une minute ne sont pas significatives. Si une agglutination est observée dans la suspension témoin, la culture n'est pas adaptée au test.

Contre-immunoélectrophorèse

Si la concentration d'antigène est faible, le précipité peut être peu visible et l'interprétation sera alors facilitée par l'utilisation d'une loupe. Les réactions sont suffisamment stables pour que les résultats restent inchangés pendant plusieurs heures, mais les lames doivent être lues immédiatement après l'arrêt de l'électrophorèse. Si l'on souhaite conserver une trace durable, les lames peuvent être lavées, colorées et séchées selon les techniques classiques.

12. LIMITES DE LA METHODE

L'absorption des sérums d'agglutination de *H. influenzae* a été effectuée de façon à assurer leur spécificité pour l'espèce *H. influenzae*. Toutefois des réactions croisées ont été observées avec des organismes d'autres espèces.[1,5,6] Il est important de confirmer l'espèce de l'organisme isolé par les techniques classiques de morphologie, de culture et de biochimie. Cette réserve s'applique toutes les méthodes de tests sérologiques et rappelle que la CIEP doit compléter les techniques classiques plutôt que les remplacer.

Si la concentration d'antigène n'est pas suffisante dans l'échantillon, le résultat obtenu sera alors négatif.

Les antisérums fournissent uniquement une identification sérologique ; l'identification complète d'un organisme doit se faire uniquement en association avec un test biochimique.

13. RESULTATS ATTENDUS

Agglutination ou précipitation visible en présence de cultures et antigènes homologues.

14. CARACTERISTIQUES SPECIFIQUES

Les antisérums ZM20/R30166001 à ZM25/R30166501 doivent donner une agglutination visible dans les tests d'agglutination sur lame et une précipitation linéaire dans le test par CIEP avec les antigènes capsulaires de *H. influenzae* de type a, b, c, d, e et f respectivement.

15. BIBLIOGRAPHIE

1. **Turk, D.C. and May, J.R.** (1967). *Haemophilus influenzae*. London, English Universities Press.
2. **Myhre, E.B.** (1974). Typing of *Haemophilus influenzae* by counterimmuno-electrophoresis. *Acta path. microbiol. scan. B.,* **82,** 164.
3. **Edwards, E.A., Muehl, P.M.** *et al.* (1972). Diagnosis of bacterial meningitis by counterimmunoelectrophoresis. *J. Lab. Clin. Med.,* **60,** 449.
4. **Myhre, E.B.** (1974). Rapid diagnosis of bacterial meningitis. *Scand. J. Infect. Dis.,* **6,** 237.
5. **Aaron, L., Handzel, Z.** *et al.* (1974). Monospecific serum for typing *Haemophilus influenzae* type b produced by immunization with *Escherichia coli* strain 'Easter'. *J. Biol. Stand.,* **2,** 25.
6. **Argaman, M., Liu, T.Y.** *et al.* (1974). Polyribitol-phosphate: an antigen of four gram-positive bacteria cross-reactive with the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J. Immunol.,* **112,** 649.

16. CONDITIONNEMENT

REF

ZM20/R30166001.....2 ml
ZM21/R30166101.....2 ml
ZM22/R30166201.....2 ml
ZM23/R30166301.....2 ml
ZM24/R30166401.....2 ml
ZM25/R30166501.....2 ml

Légende des symboles

REF	Référence de catalogue
IVD	Dispositif médical de diagnostic *in vitro*
	Consulter le mode d'emploi
	Limite de température (température de conservation)
LOT	Code de lot (numéro de lot)
	A utiliser avant (date de péremption)
	fabriqué par

CE

IFU X7809A, révisée Octobre 2013

Remel Europe Ltd.
Clipper Boulevard West, Crossways
Dartford, Kent, DA2 6PT
UK

Pour tout support technique, contacter le distributeur local.